维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)01-0031-03

人参总皂甙诱导 IL-3 基因表达的实验研究

王 璐,王亚平

(重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人参总皂甙(TSPG)对人早期造血生长因子 IL-3 基因表达的影响。方法:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、核酸分子原位杂交方法。结果:未经诱导的人 T 淋巴瘤细胞株—Jurkat 细胞 RNA 提取物的 RT-PCR 扩增产物中未见 IL-3 条带,而经 TSPG 诱导后 Jurkat 细胞 RNA 提取物的 RT-PCR 扩增产物中出现 IL-3 条带。核酸分子原位杂交显示经 TSPG 诱导的胎儿胸腺细胞、脾细胞 IL-3mRNA 表达的阳性率及阳性强度较对照组均有显著提高。结论:人参总皂甙能诱导人淋巴细胞表达 IL-3mRNA,从而促进人早期血细胞发生。

【关键词】人参总皂甙;造血生长因子;白细胞介素-3;基因表达

【中国图书分类法分类号】R331.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-05-28

Experimental study on IL-3 gene expression induced by TSPG

WANG Lu, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of TSPG (total saponins of panax ginseng) on gene expression of IL-3 which is one of the important hematopoietic growth factor at early stage of hematopoiesis. *Methods*: Techniques of RT-PCR and in situ hybridization were used. *Results*: A band corresponding to IL-3 was observed after RNA extraction from TSPG stimulated Jurkat cells were subjected to RT-PCR, while such band was not observed after RNA extraction from unstimulated Jurkat cells were subjected to RT-PCR. Comparing with the control group, both quantity and intensity of IL-3mRNA expression in fetus thymocytes and splenocytes induced by TSPG were obviously promoted. *Conclusion*: TSPG can induce human lymphocytes to express IL-3 mRNA, thus promote human hematopoiesis at early stage.

【Key words】Total saponins of panax ginseng; Hematopoietic growth factor; Interleukin-3; Gene expression

造血调控因子基因表达是造血调控研究的核心内容。血细胞发生的关键环节是造血调控因子与造血细胞膜上相应受体结合,启动核心信号转导,最终表现为蛋白质合成改变,进而引起细胞的增殖、分化、凋亡、抑制。我们既往研究证明人参总皂甙(TSPG)在体外作用能促进人早期髓系造血祖细胞(CFU-Mix)增殖分化,其作用机制尚不清楚。白细胞介素-3(IL-3)是早期髓系生成调控的主要造血生长因子之一,其限制性表达于活化的 T 淋巴细胞[1]。本实验通过 RT-PCR、核酸分子原位杂交方法观察经 TSPG 诱导后人淋巴细胞表达 IL-3mRNA 的变化,旨在研究 TSPG 是否通过增强 IL-3 的基因表达,进而促进人早期血细胞发生。

作者介绍:王 璐(1974-),讲师,
主要研究方向:造血调控及其机理。

1 材料与方法

1.1 T 淋巴瘤细胞株—Jurkat 细胞株

天津血液研究所惠赠。含 10%FBS 的 1MDM 培养液培养,隔 2~3h 振荡 1 次,2d 后分瓶传代。

1.2 胎儿胸腺细胞、脾细胞

取正常妊娠中晚期(28~40 周)引产胎儿的胸腺和脾脏,用扁形药勺将细胞逐渐挤推于培养液中,洗涤后细胞经密度为 1.077 的淋巴细胞分离液分离,取出细胞层充分洗涤后,加入含 10%BS 的 1640 培养液中常规培养[2]。

1.3 主要试剂

IL-3PCR 引物序列[3] P_1: 5′-CCAAACATGAGCCGCCTGCCC-3′, P_2: 5′-TCAAAAGATCGCGAGGCTCAA-3′,由上海生工合成。β-actin 引物 P_1: 5′-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3′, P_2: 5′-CAGGGTACATGGTGGTGCC-3′。IL-3 寡核苷酸探针[4] 5′-GTACTCG-

维普资讯 http://www.cqvip.com

GCGGACGGGCAGGACGAGGACGAGGT－3′，由上海博亚生物技术有限公司合成。核酸分子原位杂交试剂盒：武汉博士德产品。

1.4 RT－PCR 检测 Jurkat 细胞 IL－3mRNA 的表达

实验分组：对照组：常规培养；TSPG 诱导组：培养体系中加入 TSPG 50μg/ml；阳性对照组：培养体系中加入 ConA 10μg/ml，PHA 4μg/ml。37℃，5% CO_2 培养箱中培养 6h 后提取细胞总 RNA，25μl 反应体系进行逆转录：2μl RNA，100ng Oligo$(dT)_{16}$，200U M－MLV 逆转录酶，20U Rasin，0.2mmol/L dNTP。PCR 反应按 50μl 体系进行：10×PCR Buffer 5μl，cDNA 4μl，primer 25pmol，dNTP 0.2mM，Mg^{2+} 1.5mM，Taq 酶 2.5U。95℃变性 1min，50℃退火 1min，72℃延伸 90s，35 个循环后 72℃延伸 10min。设立 PCR 反应阴性对照（以 DEPC 水代替 RNA）模板）及 PCR 反应内参（以 β－actin 作为引物）在同样条件下进行 PCR 扩增。

1.5 核酸分子原位杂交检测台儿胸腺、脾细胞 IL－3mRNA 的表达

实验分组同 1.4，培养 12h 后离心涂片，用 IL－3 寡核苷酸探针与载片进行原位杂交。每张载片计数 200 个细胞，计算阳性细胞百分率和积分指数；反应强度依据胞浆中棕黄色颗粒多少及颜色深浅分为强阳性（＋＋＋）、阳性（＋＋）、弱阳性（＋）和阴性（－）4 级，分别计为 3、2、1 和 0 分。积分指数＝阳性百分率×强度计分。

1.6 实验数据的统计学处理

经计算机 SAS 统计软件进行方差分析和 Dunnett t 检验。

2 结 果

2.1 RT－PCR 检测 TSPG 对 IL－3mRNA 表达的影响

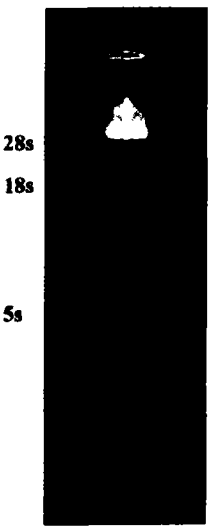


图 1 提取的细胞总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

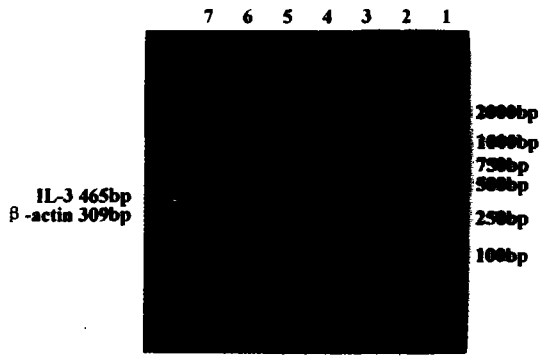


图 2 RT－PCR 检测 Jurkat 细胞 IL－3mRNA 的表达
列 1：DNA 分子量标准 列 2、3：静止状态 Jurkat 细胞 RT－PCR 扩增产物 列 4、5：ConA/PHA 诱导后 Jurkat 细胞 RT－PCR 扩增产物 列 6、7：TSPG 诱导后 Jurkat 细胞 RT－PCR 扩增产物

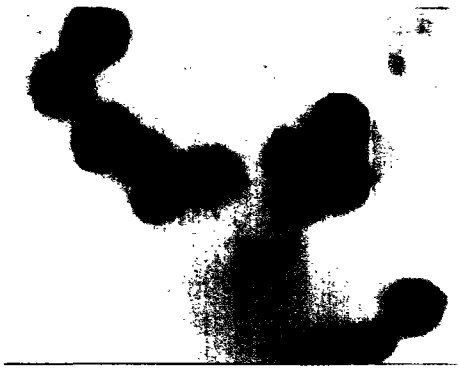


图 3 静止状态人胸腺细胞 IL－3mRNA 的表达 (ISH×1000)



图 4 TSPG 诱导后人胸腺细胞 IL－3mRNA 的表达 (ISH×1000)

细胞提取的总 RNA 电泳后可见清晰的三条带，分别为：5S、18S、28S，证明所提取的 RNA 无降解。PCR 扩增产物显示：PCR 阴性对照产物无任何条带。未经诱导的 Jurkat 细胞 PCR 扩增产物在 465bp 处未见明显条带，309bp 处可见清晰条带。经 TSPG 或阳性诱导剂 ConA＋PHA 诱导后 Jurkat 细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞 PCR 扩增产物于 465bp 处出现阳性条带，309bp 处也可见清晰条带(图 1、2)，提示 TSPG 能诱导人 T 淋巴细胞表达 IL－3mRNA。

2.2 原位杂交检测 TSPG 对 IL－3mRNA 表达的影响

原位杂交结果显示：静止状态下，胸腺细胞、脾细胞的 mRNA 表达水平较低，经 TSPG(50μg/ml)诱导后，上述细胞表达 IL－3mRNA 的阳性率及表达强度较实验对照组均有不同程度的提高(表 1，图 3、4)。

表 1 TSPG 对胸腺细胞、脾细胞表达 IL－3mRNA 的影响

组别	胸腺细胞		脾细胞	
	阳性率(%)	积分指数	阳性率(%)	积分指数
对照组(Ⅰ)	19.5±3.9	0.21±0.03	41.7±8.6	0.80±0.16
TSPG 组(Ⅱ)	49.2±10.4*	0.88±0.19*	58.1±9.6*	1.18±0.20*
ConA/PHA 组(Ⅲ)	54.2±12.3*	1.13±0.26*	56.9±11.8*	1.16±0.23*

Note: * $P<0.05$ compared with Ⅰ TSPG: 50μg/ml, ConA: 10μg/ml, PHA: 4μg/ml

3 讨 论

造血生长因子(hematopoietic growth factor, HGF)是诱导血细胞发生的重要调控因素。本课题组既往研究表明[5]：传统医学“补气生血”要药人参的主要药效成分人参总皂甙(TSPG)对人早期髓系造血祖细胞(CFU－Mix)的增殖分化有明显促进作用，经 TSPG 诱导制备的脾细胞和胸腺细胞培养上清液中 HGF 活性显著提高。由于上清液中存在的 HGF 种类繁多，TSPG 具体作用于哪种 HGF 尚不清楚。IL－3 是早期髓系生成调控的主要 HGF，在 CFU－Mix 体外培养体系中其对集落的形成是必不可少的。本实验研究目的在于阐明 TSPG 促进人早期血细胞发生与 IL－3 基因表达的关系。

IL－3 仅限制性表达于活化的淋巴细胞。IL－3 在淋巴细胞内的激活必须通过 TCR/CD3 旁路或模拟该旁路的试剂[6]。TCR/CD3 复合物以及其它特异性的抗体和对应的 T 细胞表面受体结合形成的复合物均可激活磷脂酶 C，使 α－磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)水解，产生三磷酸肌醇(IP_3)及甘油二酯(DG)。IP_3 促使细胞内游离 Ca^{2+} 升高，DG 则在 Ca^{2+} 及磷脂的协同下激活蛋白激酶 C (PKC)，PKC 与 Ca^{2+} 协同作用可促进 c－fos 基因的表达，进一步诱生出特异性的 DNA 结合蛋白——AP 家族蛋白，形成转录因子复合物，与 IL－3 基因 5′侧翼的 AP－1 位点或 NF－IL－3 位点结合，共同作用促进 IL－3mRNA 的表达。刀豆蛋白 A(ConA)和植物血凝素(PHA)由于既能激活 PKC 又能同时提高胞内 Ca^{2+} 浓度而被作为公认的阳性诱导剂用于 IL－3 基因表达调控的研究中[1,7]。大量文献报道[1,8]，经 ConA、PHA 刺激的 T 淋巴细胞于刺激 1h 后开始产生 IL－3mRNA，高峰时段为 6～8h，以后随着时间的延长，IL－3mRNA 表达的量逐渐减少。本实验选定人 T 淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞为研究对象，将培养 6h 后的 Jurkat 细胞进行实验分组，在同样的条件下提取 RNA，进行逆转录、PCR 扩增，实验结果显示：未经刺激的 Jurkat 细胞内未能检测出 IL－3mRNA 的表达；经 TSPG 或 ConA/PHA 诱导后的 Jurkat 细胞 IL－3mRNA 表达呈阳性。这提示：TSPG 能激活 T 淋巴细胞使其产生 IL－3mRNA。

核酸分子原位杂交方法除了能对 mRNA 表达进行定量分析外，还能准确地显示 mRNA 表达的具体部位以进行定位分析。胸腺是人体内 T 淋巴细胞增殖分化的场所，胎儿、婴幼儿的胸腺很发达，其内的 T 淋巴细胞对刺激物和诱导因素有较强反应；脾脏富含 T、B 淋巴细胞，且在胎儿时期其本身是一个重要的造血场所。故本实验进一步选用胎儿胸腺细胞、脾细胞模拟人体内与造血密切相关的淋巴细胞，通过核酸分子原位杂交方法研究 TSPG 对人体内淋巴细胞表达 IL－3mRNA 的影响。结果表明：经 TSPG 诱导后，胎儿胸腺细胞、脾细胞内 IL－3mRNA 表达的阳性率以及阳性强度均显著提高。提示 TSPG 能诱导体内淋巴细胞表达 IL－3mRNA。这与 RT－PCR 的实验结果吻合。

研究提示：TSPG 能诱导增强人淋巴细胞 IL－3 的基因表达，从而提高 IL－3 的造血生长因子活性，促进人早期血细胞发生。

(下转第 40 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

的激活发生于炎症区的毛细血管内皮的表面,从而激活纤溶酶原,使纤维蛋白和微血栓溶解,血管通透性增高,被认为与粘膜出血和粘膜脆性增加有关[7]。研究结果显示,实验鼠结肠组织中的蛋白酶活性比正常对照显著增高,并与病变的严重程度一致。

UTI 是一种广谱的酶抑制剂,可抑制多种蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、木瓜蛋白酶、纤溶酶等[8]。本实验利用其具有广谱蛋白酶抑制作用的特点,来抑制结肠组强中的蛋白酶活性。我们采用了两种方案:一是在 DNBS/乙醇灌肠时静脉注射 UTI 2.5 万 U/kg 体重;二是在 DNBS/乙醇灌肠后 12、24、36h 分别静脉注射 UTI1 万 U/kg 体重。研究证明,UTI 可使鼠 UC 结肠组织中的蛋白酶活性下降至对照组的 1/3,其中,第二种方案对蛋白酶活性的抑制作用更好。但是,在观察的第 7 天,UTI 对蛋白酶活性的抑制作用消失,这可能是由于 UTI 半衰期短(血浓度半衰期为 40min)而疗程又短所致。通过对实验鼠腹泻、病变标本的大体和镜下形态的观察,显示出 UTI 使病变的严重程度降低。

实验结果提示,蛋白酶与 UC 的发病有关,而尿胰蛋白酶抑制剂能显著降低病变结肠组织中的蛋白酶活性,因此有可能成为一种治疗 UC 的新手段。采用大动物、长疗程能进一步观察尿胰蛋白酶抑制剂对实验性 UC 的治疗效果。

参 考 文 献

[1] Hawkins JV, Emmel EL, Feuer JJ, et al. Protease Activity in a hapten - induced model of ulcerative colitis in rats[J]. Dig Dis Sci, 1997;42(9):1969 - 1980.

[2] Bohe M. Pancreatic and granulocytic endoproteases in faecal extracts from patients with active ulcerative colitis[J]. Scand J Gastroenterol, 1987;22(1):59 - 64.

[3] Stallmach A, Schafer F, Weber S, et al. Increased state of activation of CD4 - positive T cell and elevated interferon - γ production in pouchitis[J]. Gut, 1998;43(4):499 - 505.

[4] Andus T, Gross V, Caesar 1, et al. PMN - elastase in assessment of patients with inflammatory bowel disease[J]. Dig Dis Sci, 1993;38(9):1638 - 1644.

[5] Kurose 1, Miura S, Suematsu M, et al. Tissue - type plasminogen activator of colonic mucosa in ulcerative colitis - evidence of endothelium - derived fibrinolytic activation[J]. Dig Dis Sci, 1992;37(2):307 - 311.

[6] Stallmach A, Chan CC, Ecker KW, et al. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis[J]. Gut, 2000;47(3):415 - 422.

[7] Kwaan HC, Cocco A, Mendeloff A1, et al. Fibrinolytic activity in the normal and inflamed rectal mucosa. Scand J Gastroenterol[J]. 1969;4(5):441 - 445.

[8] 潘 成,虞惠康,罗月娥. 注射用乌司他[J]. 中国新药杂志, 2000;9(1):123.

(上接第 33 页)

参 考 文 献

[1] Charlotte MN, Colin AS, Bernard MP, et al. Expression of human interleukin - 3(multi - CSF)is restricted to human lymphocytes and T - cell tumor lines[J]. Blood, 1989;73(4):945 - 951.

[2] 刘秀珍. 造血祖细胞培养技术实验手册[M]. 北京:北京出版社, 1993, 154 - 155.

[3] 陈鸿书,曹廷兵,姚家慧,等. RT - PCR 制备人 IL - 3cDNA 的改进[J]. 第三军医大学学报, 1996;18(3):253 - 254.

[4] Dorssers L, Burger L, Bot F, et al. Characterization of a human multilineage - colony - stimulating factor cDNA clone identified by a conserved noncoding sequence in mouse IL - 3 [J]. Gene, 1987;55:115 - 125.

[5] 王 璐,王亚平. 人参总皂甙对人淋巴细胞表达早期造血生长因子的影响[J]. 解剖学杂志, 2003;

[6] Sara CG, Gregory S, Laurence AT, et al. Regulation of interleukin - 3 gene induction in normal human T cell[J]. J Clin Invest, 1989;84:1701 - 1705.

[7] 叶治家,董燕麟,曹廷兵,等. 小鼠脾淋巴细胞白细胞介素 - 3 基因表达的调节[J]. 第三军医大学学报, 1996;18(1):19 - 21.

[8] Ryan GR, Milton SE, Lopez AF, et al. Human interleukin - 3 mRNA accumulation is controlled at both the transcriptional and posttranscriptional level[J]. Blood, 1991;77(6):1195 - 1202.